第 38 卷第 7 期
2018 年 4 月
生 态 学 报
ACTA ECOLOGICA SINICA
Vol.38,No.7
Apr.,2018

DOI: 10.5846/stxb201704130657
张丹丹,张丽梅,沈菊培,旺姆.珠穆朗玛峰不同海拔梯度上土壤细菌和真菌群落变化特征.生态学报,2018,38(7):2247-2261.
Zhang D D, Zhang L M, Shen J P, Wang M.Soil bacterial and fungal community succession along an altitude gradient on Mount Everest.Acta Ecologica Sinica,2018,38(7):2247-2261.

珠穆朗玛峰不同海拔梯度上土壤细菌和真菌群落变化特征

张丹丹[1,2],张丽梅[1,2],沈菊培[1,2],旺　姆[3,*]
1 中国科学院生态环境研究中心　城市与区域国家重点实验室,北京　100085
2 中国科学院大学,北京　100049
3 西藏农牧学院,林芝　860000

摘要:高寒生态系统是全球变化的敏感区域,揭示高海拔地区尤其是雪线以上土壤微生物群落的演变规律,对于理解全球气候变化对高寒生态系统的影响及其响应机制具有重要意义。以采自青藏高原珠穆朗玛峰北坡低海拔地区和永久雪线以上(海拔 4000—6550m)的 12 份土壤和砂砾样品为研究对象,运用活菌计数法(CFU)和实时定量 PCR(real-time PCR)技术对土壤样品的细菌和真菌进行了定量分析,并结合磷脂脂肪酸(PLFA)分析法、变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)和克隆测序方法研究了细菌和真菌群落随海拔梯度变化的演变特征,结果表明:土壤细菌和真菌丰度随海拔增加而降低,与海拔高度呈显著负相关;磷脂脂肪酸分析结果表明不论是细菌、真菌还是总的微生物 PLFA 含量均随海拔高度增加而下降,革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌的多样性也随海拔增加而降低,且代表革兰氏阳性细菌的 PLFA 组份在雪线(5350m)以上检测不到,而代表革兰氏阴性细菌和真菌的组份在所有海拔梯度上都有分布,表明革兰氏阳性细菌比阴性细菌和真菌对海拔及海拔相关因子变化更为敏感。DGGE 图谱的 UPGMA 聚类分析的结果也发现在不同海拔高度样品中细菌群落组成发生明显变化,但真菌群落变化不明显。测序分析结果显示变形菌纲(*Proteobacteria*)是珠峰不同海拔高度土壤/砂砾样品中的优势菌群,芽单胞菌(*Gemmatimonadetes*)是高海拔样品中的优势菌群,而放线菌(*Actinobacteria*)主要分布在低海拔样品中;真菌以子囊菌门(*Ascomycota*)为主,而丝足虫类(*Cercozoa*)原生生物是高海拔冰雪覆盖样品所特有的真核生物。

关键词:海拔;细菌;真菌;多样性;PLFA

Soil bacterial and fungal community succession along an altitude gradient on Mount Everest

ZHANG Dandan[1,2], ZHANG Limei[1,2], SHEN Jupei[1,2], WANG Mu[3,*]
1 *State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100085, *China*
2 *University of Chinese Academy of Sciences, College of Resources and Environment, Beijing* 100049, *China*
3 *Agricultural and Husbandry College of Tibet, Linzhi* 860000, *China*

Abstract: Alpine ecosystems are special regions and are sensitive to global climate change. Revealing the succession of microbial communities along the altitude gradients, especially above the permanent snow line, is essential to understanding the influence of global climate change on the alpine ecosystem and the climate feedback of the alpine ecosystem. In this study, the abundance and community composition of bacteria and fungi in 12 soil and gravel samples collected from the northern slope of the Mount Everest (Tibetan Plateau) along an altitude gradient varying between 4000 and 6550m (above

基金项目:科技部“973”资助项目(2013CB956300)
收稿日期:2017-04-13;　　**网络出版日期**:2018-01-04

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: wangmutb@163.com

sea level, m.a.s.l.) were characterized by viable counting, real-time polymerase chain reaction (PCR), phospholipid fatty acid (PLFA), and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), combined with clone sequencing. The results showed that both the viable count and rRNA gene abundance for bacteria and fungi decreased with increasing altitude. The PLFA analysis showed that the contents and diversity of bacterial, fungal, and total PLFA reduced with increasing altitude. Furthermore, none of the PLFA components representing gram-positive bacteria were detected in samples above snow line (5350m), but some PLFA components representing gram-negative bacteria and fungi were distributed in all samples for low and high-altitude areas, which suggested that gram-positive bacteria were more sensitive to the changes in altitude and altitude-dependent environmental variables. The unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) analyses of the DGGE profiles showed distinct clustering in the low-altitude (4000m) and high-altitude (≥5350m) samples for bacteria communities, but not for fungal communities. The DGGE band sequencing results suggested that *Proteobacteria* were the dominant bacteria in all samples, and that *Gemmatimonadetes* were dominant in higher altitude samples, whereas *Actinobacteria* were mainly found in lower altitude samples. Fungal DGGE band sequencing showed that *Ascomycota* predominated across the altitude gradient, whereas *Cercozoa* protists, identified by the fungal 18S rRNA gene primer, were only found in relatively higher altitude samples.

Key Words: altitude; bacteria; fungi; diversity; PLFA

土壤微生物数量和种类繁多,每克土壤中微生物的数量可达几十亿,上万个物种[1]。微生物是土壤最具有生命力的组分,驱动着土壤中几乎所有已知的生物反应过程,在有机物质分解、养分循环、污染物转化与分解、温室气体产生和消减等过程中起着重要作用,对土壤肥力形成、土壤生态系统的结构和功能维持乃至全球变化都具有重要影响[1-3]。鉴于土壤微生物的重要功能及其对外界环境变化的敏感响应,土壤微生物常被用作评价环境变化的重要指标[3-4]。

全球气候变化早已成为不争的事实,据IPCC(2007)报告预测到21世纪末,全球地表温度可能升高1.1—6.4℃[5]。高寒生态系统及干旱半干旱生态系统作为全球变化的敏感区域,主要分布在北极,北部森林,青藏高原和高山苔原等地,其气候变暖速度高于地球平均水平;此外,气候变化通过改变降水格局而加速高寒生态系统退化,影响土壤微生物的群落组成和生物多样性[6]。因此,高寒生态系统对气候变化的响应与反馈不仅影响着当地生态系统,也将对全球生态系统及人类生活产生巨大影响。近年来,人们对高寒生态系统土壤微生物展开了大量的研究。Bryant 等对美国科罗拉多州落基山脉(海拔2400—3600m)细菌多样性的研究发现细菌类群丰富度、系统发育多样性均随海拔高度上升而降低[7];Margesin 等发现高山(海拔2300—2530m)和亚高山(海拔1500—1900m)土壤微生物活性随海拔增加而降低,且微生物群落组成随海拔增加变化,一些嗜冷细菌、真菌和革兰氏阴性细菌主要在高海拔地区出现[8]。Shen 等对我国长白山地区的研究也发现土壤细菌群落随海拔明显变化,细菌群落组成及优势门的相对丰度与土壤pH显著相关[9]。可见海拔相关因素在很大程度上影响着微生物的丰度和群落结构。

青藏高原是世界上海拔最高的高原,地势险峻多变,地形复杂,素有"世界屋脊"和"地球第三极"之称,是北半球气候变化的启张器和调节器,不仅直接驱动中国东部和西南部气候的变化,而且对北半球具有巨大的影响,甚至对全球的气候变化,也具有明显的敏感性、超前性和调节性[10]。青藏高原板块构造隆升形成了其独特的自然地理环境:高寒,辐射强,日照时间长,缺氧,养分浓度低,气温随高度和纬度的升高而降低。因此,表层土壤微生物群落在对抗上述极端环境过程中可能会形成特有的生存适应能力和群落组成差异。此外,由于青藏高原对全球气候的敏感性,全球变暖和CO_2浓度升高可能会对地下微生物产生复杂的影响[11]。如芦晓飞利用克隆测序技术对西藏米拉山高寒草甸土壤(海拔3600m)细菌和古菌群落多样性发现该区域存在着丰富的特殊微生物资源,但是由于受到气候变化和人类活动影响,退化草甸土壤的微生物群落结构发生改变[12]。彭岳林等对藏北高原不同海拔(海拔4584—4956m)草地植物丛枝菌根(AM)真菌种群多样性的调查

研究发现 *Glomus* 属真菌为最优势属,且草地类型、海拔高度和土壤 pH 值是影响 AM 真菌生态分布的重要因子[13]。李超男等对贡嘎山海拔梯度上(海拔 1800—4100m)土壤甲烷氧化菌的研究发现土壤理化性质和气候变化综合作用是造成甲烷氧化菌群落结构和多样性变化的主要因素[14]。

以上研究虽然都是针对青藏高原地区微生物群落开展的,但是主要集中在低海拔地区,尤其在珠峰永久雪线以上的研究非常少。鉴于青藏高原在全球变化中的特殊地位和作用,深入研究不同海拔梯度下细菌和真菌物种多样性及群落组成沿海拔高度的变化及其规律,对于理解全球气候变化对青藏高原生态系统的影响和及其响应机制具有重要意义。此外,高寒生态系统因其独特的自然气候条件,赋予了一些土壤微生物的独特优势,也是微生物资源的潜在宝库,研究青藏高原珠穆朗玛峰高原土壤微生物丰度和群落组成为合理开发利用高寒生态系统微生物资源提供参考。以往研究中,发现珠穆朗玛峰高山土壤中(海拔 4000—6550m)氨氧化细菌和古菌的丰度和群落组成随海拔梯度发生明显变化,尤其在雪线附近发生显著转变[15],但对于土壤中细菌和真菌群落整体组成情况不清楚。本研究利用活菌计数法(CFU)、实时定量 PCR(real-time PCR)技术,并结合磷脂脂肪酸 PLFA 分析法,变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)和克隆测序方法研究了青藏高原珠穆朗玛峰坡底和永久雪线以上高海拔(4000—6550m)地区土壤细菌和真菌群落的组成特征,以期为理解全球变化对青藏高原生态系统的影响以及发掘高寒地区土壤微生物资源提供基础信息。

1　材料和方法

1.1　土壤样品采集

本研究土壤样品为中国科学院第四次珠穆朗玛峰远征期间(2005 年 4 月至 6 月)采集自珠峰北部斜坡。除 3 个样品(M1—M3)取自西藏日喀则地区的农田土壤外(28°82′N,29°28′E;海拔 4000m 左右,年均温 6.3℃),其余样品(M4—M12)均采自珠峰北坡不同海拔高度(28°01′570″—28°08′385″N,86°51′533″—86°56′686″E)的裸地,海拔高度分别为 5350,5400,5700,5850,6000,6150,6300,6450,6550m。每个采样点均取 5 个重复次样点,采样时用铲子移除大石头和积雪层后采集 0—10cm 深度的土壤或细砂砾,混合后于移动冰箱运回实验室,部分样品保存于 4℃用于活菌计数和土壤理化性质分析,其余样品保存到-20℃冰箱用于 DNA 提取和分析。

1.2　磷脂脂肪酸(PLFA)分析

磷脂脂肪酸的提取方法和分析依照 Bardgett 等人描述的方法[16]。操作步骤如下:称取 4g 土壤样品于特氟龙管内,用氯仿-甲醇-磷酸缓冲液(1:2:0.8)提取总脂类,通过离心分离得到的磷脂脂肪酸经 50℃碱性甲酯化后利用气体色谱 Agilent 6820 测定土壤微生物磷脂脂肪酸的含量,以标准定性 C_{11} 到 C_{20} 混合细菌酸甲酯为外源标准(Bacterial Acid Methyl Esters CP Mix, Matreya Inc.)。每个样品进行 3 次重复实验,脂肪酸的命名方法如 Frostegard 等人[17]描述。细菌生物量通过 3-OH 12:0,14:0, 2-OH 14:0,i-15:0,和 a-15:0,15:0,i-16:0,16:1ω9c,16:0,i-17:0,17:0cy 和 10Me18:0 的脂肪酸进行估算[18-21],真菌生物量用 18:2ω9,12,18:1ω9c,18:1ω9t进行估算[17-20]。此外,革兰氏阳性细菌通过 i-15:0、a-15:0、i-16:0,i-17:0 和 10Me18:0 估算,革兰氏阴性细菌利用 3-OH 12:0,14:0, 2-OH 14:0,15:0,16:1ω9c,16:0 和 17:0cy 计算[22-24]。

1.3　活菌计数

样品活菌计数采用稀释平板法进行,为尽可能模仿原生境寡营养条件培养,细菌计数以 10 倍稀释的 PGY 培养基(PGY:蛋白胨 10g,酵母膏 5g,葡萄糖 1g,蒸馏水 1L,pH=7.4),真菌计数以含 50mg/L 硫酸链霉素的 10 倍稀释的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA:马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 20g,蒸馏水 1L,pH 自然)培养基进行。操作过程为:称取土壤或砂砾样品 10g,加入 90mL 无菌水后振荡 30min,取 1mL 土壤悬浮液转移到装有 9mL 无菌水试管中,充分混合,并进行系列稀释。吸取不同稀释程度的菌悬液各 0.1mL 至培养皿中,涂布均匀。在正式进行计数培养前,选择了少量样品进行温度影响试验,发现在 4℃培养一个月后细菌和真菌的(Colony forming units,CFUs)数比 22℃培养明显少,故在进行正式计数培养时将平板置于 22℃黑暗培养 7d 和

14d 后进行菌落计数,计算可培养微生物的数量。

1.4 DNA 提取和 PCR 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

土壤总 DNA 提取采用 FastDNA SPIN Kit for Soil 试剂盒(Q·BIOgene, Inc., Carlsbad, CA)进行,所有操作依照产品说明书进行,鲜土称重 0.8—1.0g,破碎速度设定为 5.5m/s,破碎时间 20s。提取的 DNA 样品在 1%的琼脂糖凝胶中进行电泳检测后使用微量分光光度计 Nanodrop® ND-1000 测定浓度和纯度(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)。

以引物 f954-gc 和 r1369[25]和引物 NS1 和 Fung GC[26](表 1)分别对细菌 16S rRNA 基因和真菌 18S rRNA 基因进行普通 PCR 扩增。PCR 扩增在 PTC-200 thermal cycler (MJ-Research, Waltham, MA) 进行,扩增程序如表 1。PCR 反应混合物的体积为 50μL,包括 1 × PCR buffer, 2mmol/L $MgCl_2$, 400nM 正反向引物浓度, 250μM dNTP, 2.5U Ex *Taq* DNA polymerase (TaKaRa Bio Inc. Otsu, Shiga, Japan),0.4mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)和 DNA 模板 10ng。所获得的 PCR 产物在 6%聚丙烯酰胺胶中进行 DGGE 电泳,细菌所用的变性胶浓度范围是 40%—60%,真菌的变性胶浓度范围为 10%—30%。电泳在 DCode Universal Detection System Instrument (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)进行。电泳条件为 120v,60℃恒温条件,7h。依照操作说明将凝胶在 1∶10000 SYBR Gold 染料 (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, USA)染色 30min 后利用凝胶呈像仪(G: BOX HR, Syngene, Frederick, USA)进行呈像扫描,并用 Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)软件分析结果。

对 DGGE 图谱中清晰条带进行切胶回收,并将胶条转移到 50μL 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液中,反复冻融 3 次以上。取上清液 2μL 用无 GC 夹子原引物再次扩增。PCR 产物以胶回收试剂盒(TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)切胶纯化后,连接到 pGEM-T Easy Vector 上(Promega, Madison, USA)试剂盒连接载体,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞(JM109)(TaKaRa, Japan),涂布到含有氨苄青霉素(Ampicillin)/IPTG/X-Gal 的 LB (Luria-Bertani)培养基上,37℃下培养 16—18h。随机选取若干白色克隆子,采用菌体直接扩增方式,用 pGEM-T Easy Vector 通用引物 T7/SP6 扩增外源插入片段。每个条带挑选 3 个阳性克隆子测序,利用 DNAMAN 6.0.3.48 (Lynnon Biosoft, USA)进行序列分析,并把所得正确长度的序列提交 NCBI 数据库进行 Blast 序列对比,下载最相似菌种序列作为系统发育树的参考序列。然后采用 Clustal W 和 Mega 4.0 软件建立 Neighbor-Joining 系统发育树,系统发育树各分支置信度由自举分析方法(Bootstrap)检验,重复 1000 次。

1.5 荧光定量 PCR 分析(real-time PCR)

利用实时荧光定量 PCR 对土壤中的细菌和真菌丰度进行定量分析,所用引物和探针具体信息详见表 1。细菌荧光定量 PCR 分析采用探针法:使用 *Taq*Man 探针 TM1389(5′-CTTGTACACACCGCCCGTC-3′)(Takara Bio Inc. Otsu, Shiga, Japan),定量引物分别为 BACT1369F(5′-CGGTGAATACGTTCYCGG-3′)/PROK1541R (5′-AAGGAGGTGATCCRGCCGCA-3′)[27];真菌扩增使用引物 ITS1f(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)/5.8s (5′-CGCTGCGTTCTTCATCG-3′)[28]。实时荧光定量 PCR 反应体系为 25μL,细菌 16S rRNA 基因的扩增使用 Premix Ex Taq™(TaKaRa),真菌 ITS 区扩增采用 SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒(TaKaRa),反应条件和引物浓度参见表 1。已提取的 DNA 经 5 或 10 倍稀释后作为模版 DNA 添加到混合体系中,其终浓度为 1—10ng,同时加入 0.4mg/mL 的牛血清白蛋白(BSA)用于减少杂质对 PCR 反应的抑制作用。每个样品做 3 个平行。

1.6 数据处理

利用 quantity one 软件对 DGGE 胶图像中条带的位置和亮度进行处理,依据数字化结果,计算多样性指数。采用 canonical correspondence analyses (CCAs)分析环境和土壤变量对微生物种间群落结构的影响,在 CANOCO 4.5 软件中进行。CFU 数据和基因拷贝数经对数转换后进行 ANOVA 分析。本研究中的统计分析在 SPSS 13.0 软件中进行,其中多组数据间的方差分析采用单因素方差分析(Duncan, $P<0.05$);相关分析采用 Spearman 相关分析。

细菌和真菌 rRNA 基因序列 GenBank 号为:(递交中)

表 1　本研究中用到的引物,探针和 PCR 条件

Table 1　Primers, probes and PCR conditions used in this study

目标基因 Target gene	引物和探针 Primer and probe	序列(5′-3′) Sequence (5′-3′)	用途 Use	扩增片段长度 Approximate amplicon length/bp	浓度 Concentration/(nmol/L)	反应程序 Thermal profile	参考文献 References
细菌 16S Rrna 基因 Bacterial 16S rRNA gene	Primers F954-GC R1369	CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCG GGGGCACGGGGG GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG GCCCGGGAACGTATTCACCG	DGGE	415	200 200	95℃ for 30 s, followed by 10 cycles of touchdown 61—56℃ for 30 s, and then by 25 cycles of 30 s at 56℃ for annealing	[25]
真菌 18S Rrna 基因 Fungal 18S rRNA gene	NS1 Fung-GC	GTAGTCATATGCTTGTCT C CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC ATTCCCCGTTACCCGTTG	DGGE	348	400 400	95℃ for 30 s, followed by 35 cycles of 30 s at 95℃, 60 s at 57 ℃ and 2 min at 72 ℃	[26]
细菌 16S Rrna 基因 Bacterial 16S rRNA gene	Primer BACT1369F Primer PROK1541R Probe TM1389F	CGGTGAATACGTTCYCGG AAGGAGGTGATCCRGCCGCA CTTGTACACACCGCCCGTC	real-time PCR	172	1000 500 500	95℃ for 30 s, followed by 35 cycles of 15 s at 95℃ and 1 min at 56℃	[27]
真菌 ITS 区 Fungal ITS region	ITS1f 5.8s	TCCGTAGGTGAACCTGCGG CGCTGCGTTCTTCATCG	real-time PCR	310	500 500	95℃ for 1 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95℃, 30 s at 53℃, 1 min at 72℃ and plate read at 83℃	[28]

2 结果

2.1 土壤的基本理化性质

土壤的基本理化性质如我们之前的研究报道[15]。海拔高度在 4000m 左右的农田土壤(M1—M3)pH 值为 8.6—8.7,海拔高于 5000m 高度的样品(M4—M12)pH 值在 9.0 至 9.1 之间(图 1A)。

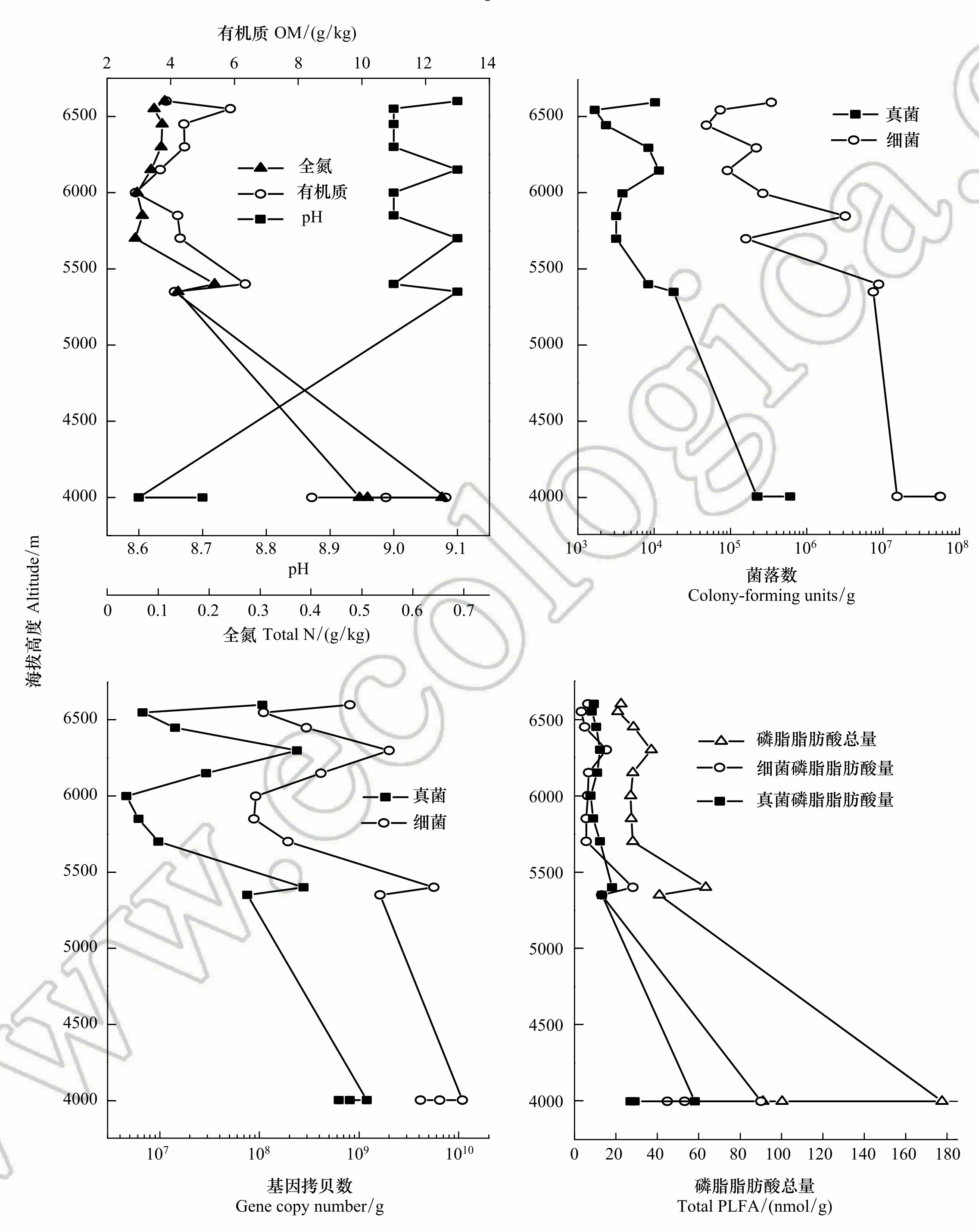


图 1 青藏高原珠穆朗玛峰不同海拔梯度土壤样品的理化性质及其细菌和真菌的丰度变化

Fig.1 Physicochemical properties and abundance changes of bacteria and fungi of soil samples along different altitudes from Mount Everest, on the Tibetan Plateau

在低海拔土壤样品中(M1—M3,4000m),有机质含量范围在 8.4—12.6g/kg 干土之间,土壤全氮在 0.51—

0.66g/kg 干土之间。而高海拔土壤样品(M4—M12,≥5350m)土壤有机质和全氮明显低于低海拔土壤样品,其有机质含量为 2.9—6.3g/kg 干土,全氮为 0.06—0.21g/kg 干土(图 1)。

2.2　细菌/真菌活菌计数和 16S rRNA 基因丰度

利用 10 倍稀释的 PGY 和 PDA 培养基对细菌和真菌进行的平板计数分析结果如图 1 所示。样品中可培养细菌数量随海拔增加而降低,在低海拔农田土壤样品(M1—M3)中达每克干土含(1.53—5.68)×10^7CFU/g,高海拔土壤/砂砾样品(M4—M12,≥5350m)(每克干重含 7.36×10^4—8.83×10^6CFU/g)高 1 到 2 个数量级。所有土壤中可培养真菌的数量均较细菌低 2 个数量级,但变化趋势与细菌相似,在低海拔农田土壤中为每克干土(2.21—6.09)×10^5CFU/g 之间,高海拔样品(M4—M12,≥5350m)中为 1.67×10^3—1.16×10^4CFU/g 干土。相关分析结果表明,细菌和真菌的 CFU 均与海拔高度呈负相关(r_1=-0.797,r_2=-0.656,P<0.05),与全氮含量呈显著正相关(r_1=0.534,r_2=0.565,P<0.05)。

利用实时荧光定量 PCR 技术对细菌的 16S rRNA 基因丰度和真菌 ITS 丰度进行的分析结果表明,细菌 16S rRNA 基因丰度随海拔高度增加而降低,在低海拔农田土壤样品(M1—M3)达 4.13×10^9—1.09×10^{10}拷贝数/g 干土,高于高海拔样品(M4—M12,≥5350m)(8.82×10^7—5.63×10^9拷贝数/g 干土)1 到 2 个数量级;所有土壤真菌 ITS 丰度较细菌低 1 个数量级,但其变化趋势与细菌相类似,在低海拔土壤样品中丰度范围在 6.27×10^8拷贝数/g 干土至 1.20×10^9拷贝数/g 干土之间,在高海拔土壤样品中丰度在 4.63×10^6—2.77×10^8拷贝数/g 干土之间变化(图 1)。与活菌计数结果类似,细菌的 rRNA 基因和真菌 ITS 的丰度与土壤海拔高度呈显著负相关(r_1=-0.481,r_2=-0.543,P<0.05),与土壤有机质(r_1=0.606,r_2=0.636,P<0.05)和全氮(r_1=0.667,r_2=0.697,P<0.05)呈正相关(表 2)。

表 2　土壤基本属性与多种微生物多样性相关分析

Table 2　Correlation analyses among soil physical parameters and diverse microbial abundance parameters

因子 Factor	海拔 Altitude	pH	有机质 OM	全氮 Total N	真菌 ITS 基因拷贝数 Fungal ITS gene copy numbers	细菌 16S rRNA 拷贝数 Bacterial 16S rRNA gene copy numbers	真菌 CFU Fungal CFU	细菌 CFU Bacterial CFU	总磷脂脂肪酸 Total PLFA	细菌磷脂脂肪酸 Bacterial PLFA
	肯德尔相关系数 Kendall′s correlation coefficient									
海拔 Altitude										
pH	0.312									
有机质 OM	-0.326	-0.664**								
全氮 Total N	-0.388	-0.521*	0.576**							
真菌拷贝数 Fungal copy	-0.543*	-0.449	0.636**	0.697**						
细菌拷贝数 Bacterial copy	-0.481*	-0.377	0.606**	0.667**	0.909**					
真菌 CFU Fungal CFU	-0.656**	-0.253	0.229	0.565*	0.534*	0.565*				
细菌 CFU Bacterial CFU	-0.797**	-0.470	0.351	0.534*	0.504*	0.443*	0.646**			
总磷脂脂肪酸 Total PLFA	-0.605**	-0.413	0.606**	0.727**	0.848**	0.818**	0.626**	0.565*		
细菌磷脂脂肪酸 Bacterial PLFA	-0.636**	-0.413	0.455*	0.576**	0.758**	0.788**	0.779**	0.657**	0.788**	
真菌磷脂脂肪酸 Fungal PLFA	-0.698**	-0.305	0.576**	0.636**	0.818**	0.788**	0.595**	0.595**	0.848**	0.758**

2.3　细菌和真菌磷脂脂肪酸含量和组分

磷脂脂肪酸分析结果表明,不同海拔梯度样品的磷脂脂肪酸总量(total PLFA)在 20.86 和 177.58nmol/g 之间,其中细菌来源的磷脂脂肪酸含量在 8.87—108.42nmol/g 之间,真菌来源的为 7.82—58.16nmol/g,无论是

总的 PLFA 含量,还是细菌和真菌的 PLFA 含量均随着海拔增加而降低(图 1,图 2),与海拔呈显著负相关($P<0.05$),与有机质和全氮含量呈显著正相关($P<0.05$)(表 2)。

在供试的 12 个土壤样品中,共检测到 15 种 C_{12}—C_{18}的 PLFAs 组分,所有样品中均检测到饱和脂肪酸(3-OH 12:0,14:0, 2-OH 14:0,i-15:0, a-15:0,15:0,i-16:0, 16:0,i-17:0 和 10Me18:0)、单不饱和脂肪酸、多不饱和脂肪酸和环丙烷脂肪酸。随着海拔高度增加,样品中 PLFA 种类和数量逐渐降低,其中低海拔土壤样品(M1—M3)含有 15 个单体 PLFAs,M4 和 M5 其次,含有 12 个单体 PLFAs,而在海拔高度高于 5700m 的样品中(M6—M12),仅含有 7 种 PLFAs,但这 7 种 PLFAs(2-OH 14:0, 16:1ω9c, 16:0, 18:0,18:2ω9,12, 18:1ω9c, 18:1ω9t)在所有海拔高度样品中均有分布,其中 2-OH 14:0, 16:1ω9c, 16:0 代表革兰氏阴性细菌的特征脂肪酸[22-23],18:2ω9,12, 18:1ω9c 和 18:1ω9t 代表真菌的特征脂肪酸[22-23]。而代表革兰氏阳性细菌的i-15:0, i-17:0 和代表革兰氏阴性细菌的 17:0△在海拔大于 5350m 的样品(M4—M5)中未检测到,代表革兰氏阴性细菌的 3-OH 12:0,14:0,15:0 和代表革兰氏阳性细菌的 i-15:0 和 i-16:0 的组份在海拔≥5700m 的样品(M6—M12)中均未检测到(图 2),表明这些微生物类群不能适应于高海拔环境。

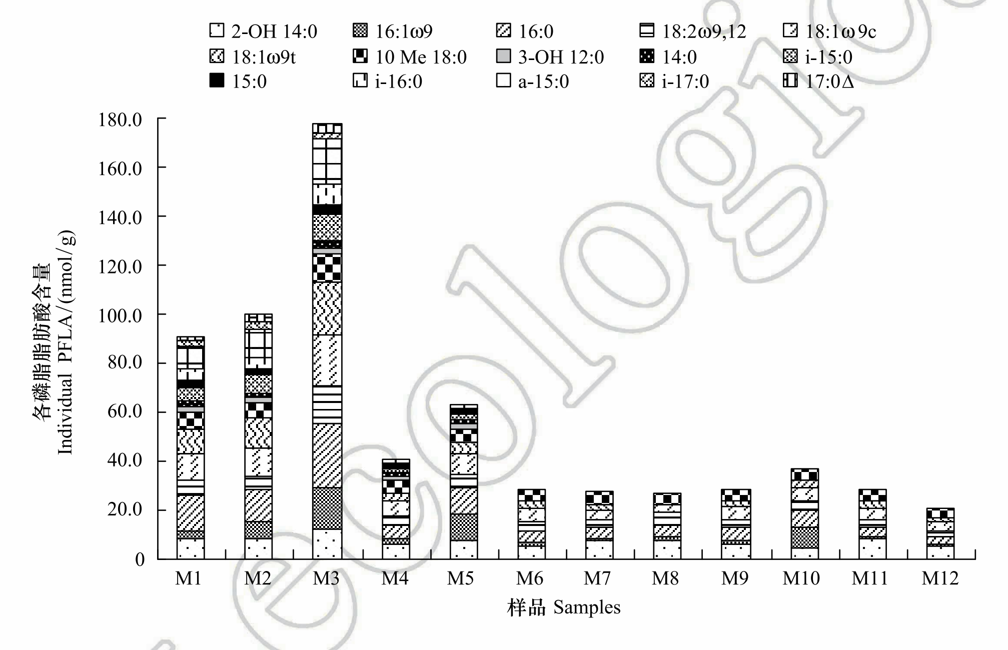


图 2 青藏高原珠穆朗玛峰不同海拔梯度样品中的 PLFA 种类分布

Fig.2 The content of PLFA composition in samples from Mount Everest, on the Tibetan Plateau

M1—M3 代表低海拔农田土壤样品(4000m),M4—M12 代表高海拔土壤样品(≥5350m)

对磷脂脂肪酸 PLFAs 组成与环境变量进行的典范对应分析(Canonical correspondence analysis)结果显示,具有相似海拔高度的样品聚集在一起,其中,低海拔农田土壤样品(M1—M3)和高海拔土壤样品(M4—M12)沿 y 轴分开,而来自最高海拔的样品(M10—M12)与海拔稍低的样品(M4—M9)沿 x 轴被分开,x 轴和 y 轴分别解释了 87.2%和 7.4%的变异。此外,海拔高度、土壤有机质和全氮对 PLFAs 的组成影响显著($P<0.05$)(图 3)。

2.4 不同海拔梯度样品细菌和真菌群落组成

对细菌 16S rRNA 基因和真菌 18S rRNA 基因的变性梯度凝胶电泳(DGGE)后,利用 quantity one 软件对 DGGE 胶图像中条带的位置和亮度进行提取后,进行 UPGMA 聚类分析结果显示,细菌 UPGMA 聚类分布图中低海拔农田土样(M1—M3)聚成一个小支,与高海拔样品明显分开(图 4),表明低海拔农田土壤和高海拔样品中细菌群落组成明显不同。对于真菌来说,则只观察到高海拔样品(M10—M12)单独聚集(图 5)。总的来说,低海拔农田土壤样品(M1—M3)DGGE 图谱更相似,而在高海拔土壤样品(M4—M12,≥5350m)中,细菌和真菌条带数量均在 M5 样品中最高。

选择细菌 DGGE 图谱中代表低海拔土壤样品 M1 和代表高海拔土壤样品 M4、M5、M6 和 M9 清晰条带进行克隆测序并构建细菌系统发育树(图 6),结果发现,在 M1 样品中检测到变形菌纲(Proteobacteria)、酸杆菌纲(Acidobacteria)和放线菌纲(Actinobacteria),M4 样品中检测到变形菌纲(Proteobacteria),M5 中检测到变形菌纲(Proteobacteria),芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes),蓝藻菌纲(Cyanobacteria),异常球菌属(Deinococcus-Thermus),厚壁菌门(Fimicutes),装甲菌门(Armatimonadetes),拟杆菌纲(Bacteroidetes)和放线菌纲(Actinobacteria),M6 中检测到放线菌纲(Actinobacteria),M9 中检测到酸杆菌纲(Acidobacteria),其中 5 个样品中处于同一位置的 DGGE 条带测序结果一致。从图 6 可以看到,所有土样中均含有区域 1(条带 24)和区域 3(条带 10)的条带,测序结果显示这两个区域的条带代表变形菌纲(Proteobacteria),说明变形菌是青藏高原地区的优势菌群; 区域 2 条带 6 和 25 代表芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)仅分布在高海拔样品中;此外,区域 4 条带 3 代表的放线菌纲(Actinobacteria)主要分布在低海拔样品中,在高海拔样品中较为少见。由于真菌 DGGE 图谱中不同海拔高度土壤样品清晰条带较少,将所有清晰条带克隆测序并构建了真菌系统发育树(图 7),结果显示真菌序列分布在子囊菌门(Ascomycetes)、担子菌门(Basidiomycota)和其他真核生物(Cercozoa)三个簇中;结合 DGGE 图谱可以看出区域 1 条带 4,5 和 30 代表 Cercozoa 仅分布在高海拔样品中,而区域 2 条带 17,20 代表子囊菌门(Ascomycetes)在所有土样中均有分布,说明子囊菌门(Ascomycetes)为青藏高原地区的优势菌群(图 7)。

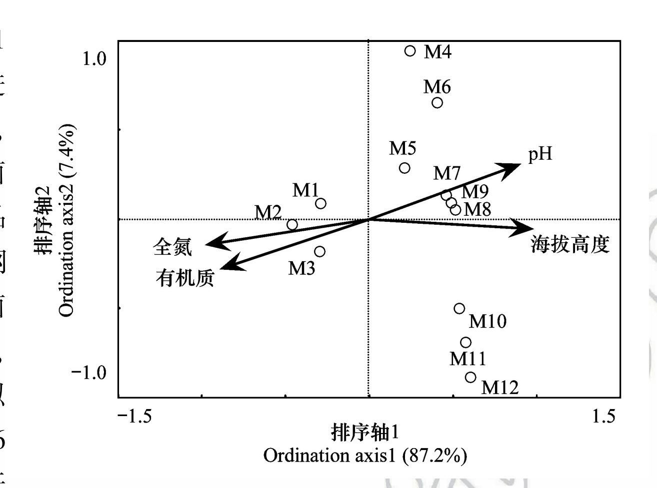


图 3　微生物磷脂脂肪酸群落组成与环境变量的典范对应分析(CCA)

Fig.3　Canonical correspondence analysis of PLFA composition and environmental variables

M1—M3 代表低海拔农田土壤样品(4000m),M4—M12 代表高海拔土壤样品(≥5350m)

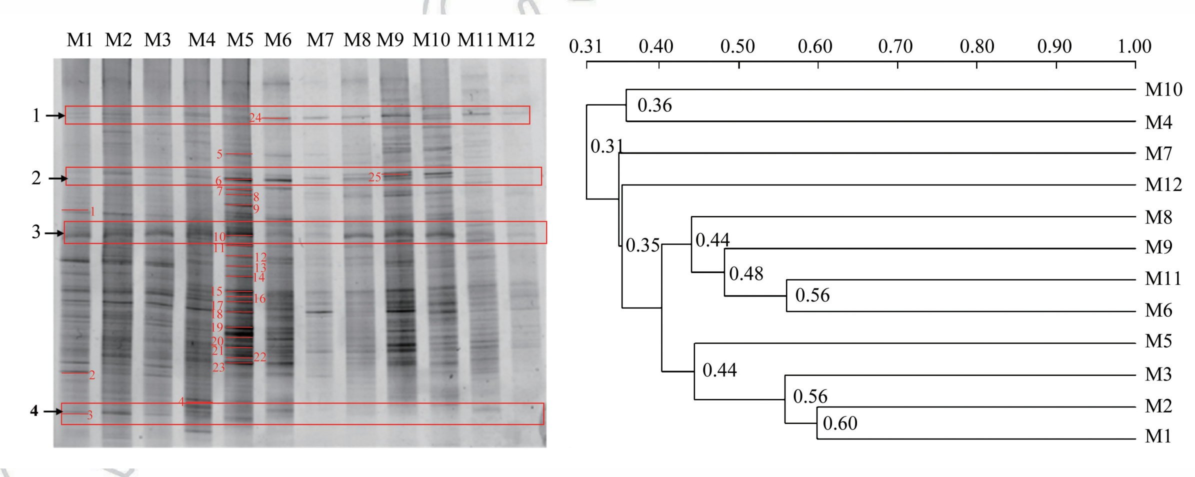


图 4　青藏高原珠穆朗玛峰不同海拔梯度下土壤样品中细菌 DGGE 图谱及其 UPGMA 聚类分布

Fig.4　Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles and the UPGMA dendrogram of bacteria in soils from Mount Everest, on the Tibetan Plateau

3　讨论

3.1　细菌和真菌数量随海拔增加的变化特征

本研究中,用 10 倍稀释的细菌和真菌培养基进行的活菌计数结果表明低海拔土壤样品细菌 CFU 数

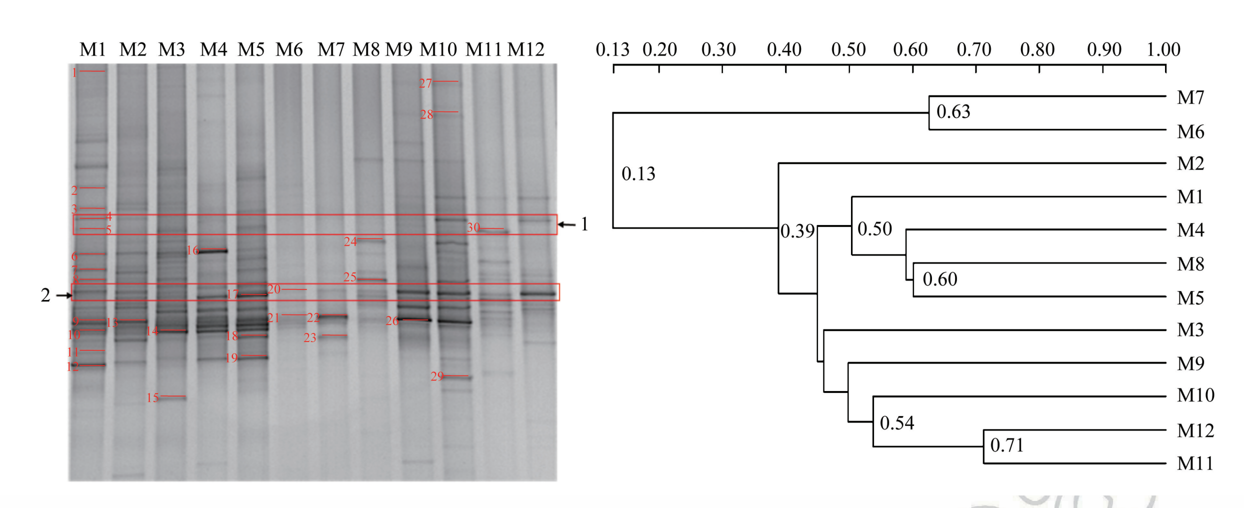


图 5 青藏高原珠穆朗玛峰不同海拔梯度下土壤样品中真菌 DGGE 图谱及其 UPGMA 聚类分布

Fig.5 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles and the UPGMA dendrogram of fungi in soils from Mount Everest, on the Tibetan Plateau

(1.53—5.68)×10^7CFU/g 明显高于高海拔样品(7.36×10^4—8.83×10^6CFU/g)。类似地,真菌 CFU 分布情况与细菌一致,低海拔土壤样品 CFU(2.21—6.09×10^5CFU/g)较高海拔样品高 1—2 个数量级(1.67×10^3—1.16×10^4CFU/g)。利用荧光定量 PCR 技术对细菌 16S rRNA 和真菌 ITS 基因丰度的分析结果与活菌和真菌计数结果一致,低海拔土壤样品细菌和真菌丰度明显高于高海拔地区土壤样品 1 到 2 个数量级。相关分析结果表明无论细菌和真菌的 CFU 数量,还是 16S rRNA 和 ITS 基因拷贝数均与全氮和有机质显著正相关,与海拔高度显著负相关性。此外,细菌和真菌 PLFA 量随海拔增加而降低,与土壤海拔呈负相关,与有机质和全氮呈显著正相关。随海拔高度增加,土壤养分、氧气、温度降低,辐射增加,这些都可能是导致微生物生长代谢减弱、生物量随海拔增加而减少的决定性因素。结果与以往在青藏高原腹地海拔高度在 3400—4300m 的三江源自然保护区高寒草原的研究结果一致,说明即使在严酷的生存环境下,青藏高原仍存有丰富的微生物类群,且高海拔高寒等极端环境明显抑制了微生物的活动从而导致其微生物量逐渐降低[31-32]。此外,CFU 和荧光定量 PCR 结果显示青藏高原珠穆朗玛峰土壤样品中细菌丰度明显高于真菌丰度一个数量级,且细菌和真菌变化趋势呈正相关关系(r=0.909, P<0.05),这与任佐华等人对青藏高原高寒草地土壤(海拔 3400—4200m)微生物活性和微生物量的研究结果相类似[31-33],导致这种现象的原因可能是细菌和真菌占据的生态位相似,在青藏高原极端生存环境下,细菌由于个体小,繁殖快在资源竞争中处于优势[34-36]。

3.2 不同海拔梯度上细菌和真菌的群落组成特征

磷脂脂肪酸(PLFA)常用来表征复杂环境中具有活性的微生物群落组成。在 12 个供试样品中共检测到 15 种 PLFAs,包括代表革兰氏阳性细菌的脂肪酸组份 i-15:0、a-15:0、i-16:0 和 i-17:0,代表革兰氏阴性细菌的组份 3-OH 12:0,14:0, 2-OH 14:0,15:0,16:1ω9c,16:0,17:0△和 10Me 18:0,和代表真菌的组份 18:2ω9,12,18:1ω9c,18:1ω9t。无论是细菌还是真菌的脂肪酸组分均随海拔增加而减少,主要表现为海拔高度大于 5350m(雪线)时,表征革兰氏阳性细菌的脂肪酸(a-15:0 和 i-17:0)未被检测到,当海拔高度增加到 5700m 以上时,表征革兰氏阳性细菌的所有脂肪酸(i-15:0、a-15:0、i-16:0 和 i-17:0)均未被检测到。同时,表征革兰氏阴性细菌的脂肪酸 17:0△在海拔高度大于 5350m 时未被检测到,当海拔增加到 5400m 时,3-OH12:0 和 14:0 也未被检测到,但 2-OH 14:0,16:1ω9c 和 16:0 脂肪酸在全部样品中均有分布,说明青藏高原珠穆朗玛峰土壤中细菌多样性随海拔增加而降低,且革兰氏阳性细菌对海拔高度的变化较革兰氏阴性细菌更为敏感,可能的原因是革兰氏阳性细菌细胞壁结构简单,只含有 90%肽聚糖和 10%磷壁酸,其对抗外界环境变化的缓冲能力较弱,而革兰氏阴性细菌细胞壁较为复杂,不仅含有肽聚糖,其细胞壁外还有由脂多糖、磷脂和脂蛋白等若干种蛋白质组成的外膜能够有效的阻止或减缓有害物质或恶劣环境对细胞的迫害,从而保护细胞的正常生长代

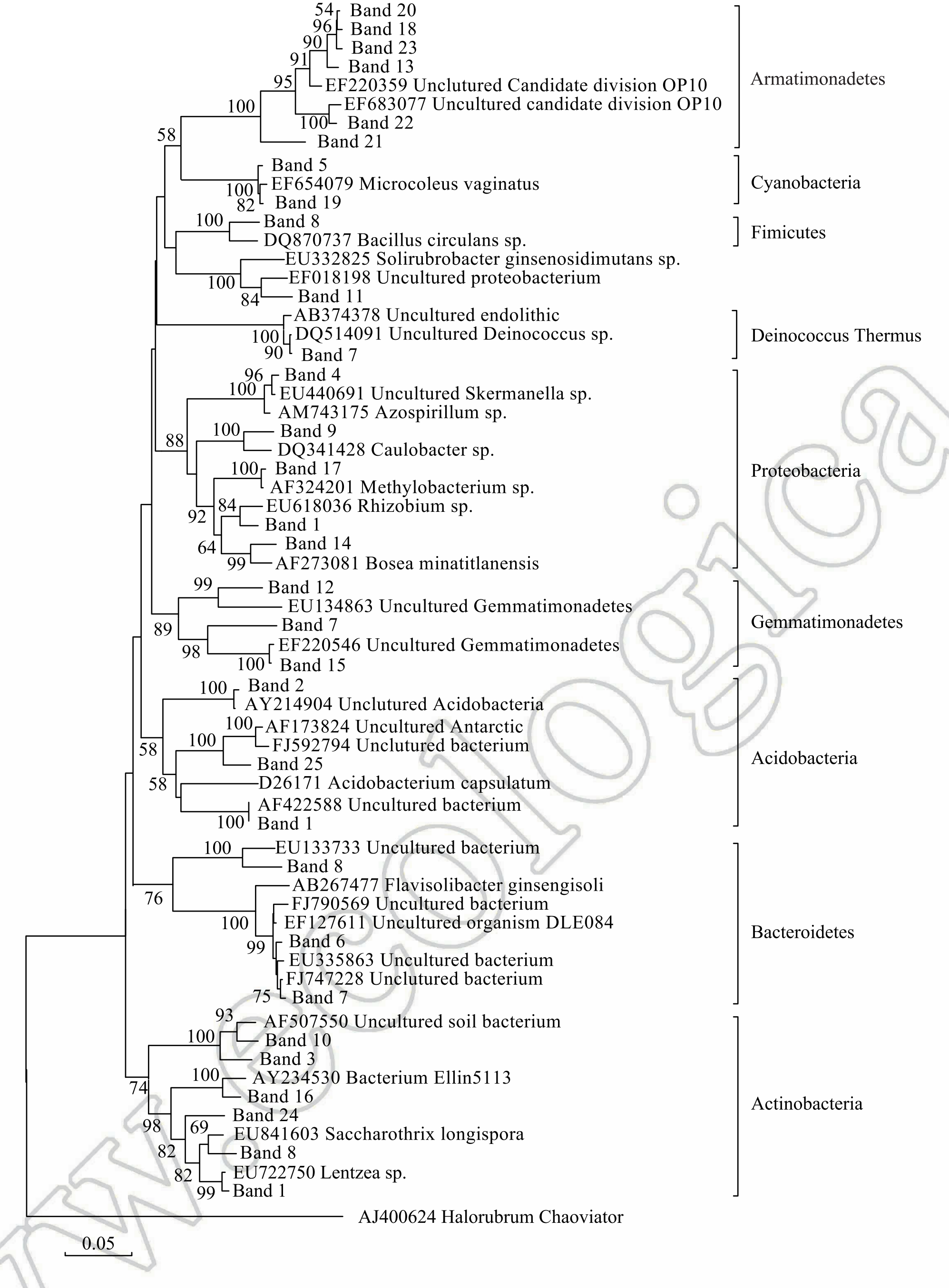


图 6　细菌 16S rRNA 基因系统发育树

Fig.6　Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA gene in soils from Mount Everest, on the Tibetan Plateau

谢[37]。此外,表征真菌的 PLFAs(18:2ω9,12,18:1ω9c,18:1ω9t)在所有土壤样品中均有分布,说明海拔高度增加未能影响真菌在高山土壤的分布,与蔡晓布等在西藏高原草地生态系统中观察到的结果一致[38],这可能是由于真菌在生理上更耐受低温,以及其通过产生孢子抵御不良环境等所致。该结果与 DGGE 图谱的 UPGMA 聚类分析结果相一致,再次表明不同海拔高度能够显著影响细菌群落组成,但对真菌群落变化没有显著影响。

对微生物磷脂脂肪酸 PLFA 组成与环境变量的典范对应分析(Canonical correspondence analysis)结果表明海拔高度、土壤有机质和全氮是决定极端环境下高山土壤微生物群落的组成和多样性的主要因子。与对微生物量的影响相似,随着海拔上升,植被逐渐退化,土壤养分减少,不仅影响土壤微生物数量,也会对土壤中微

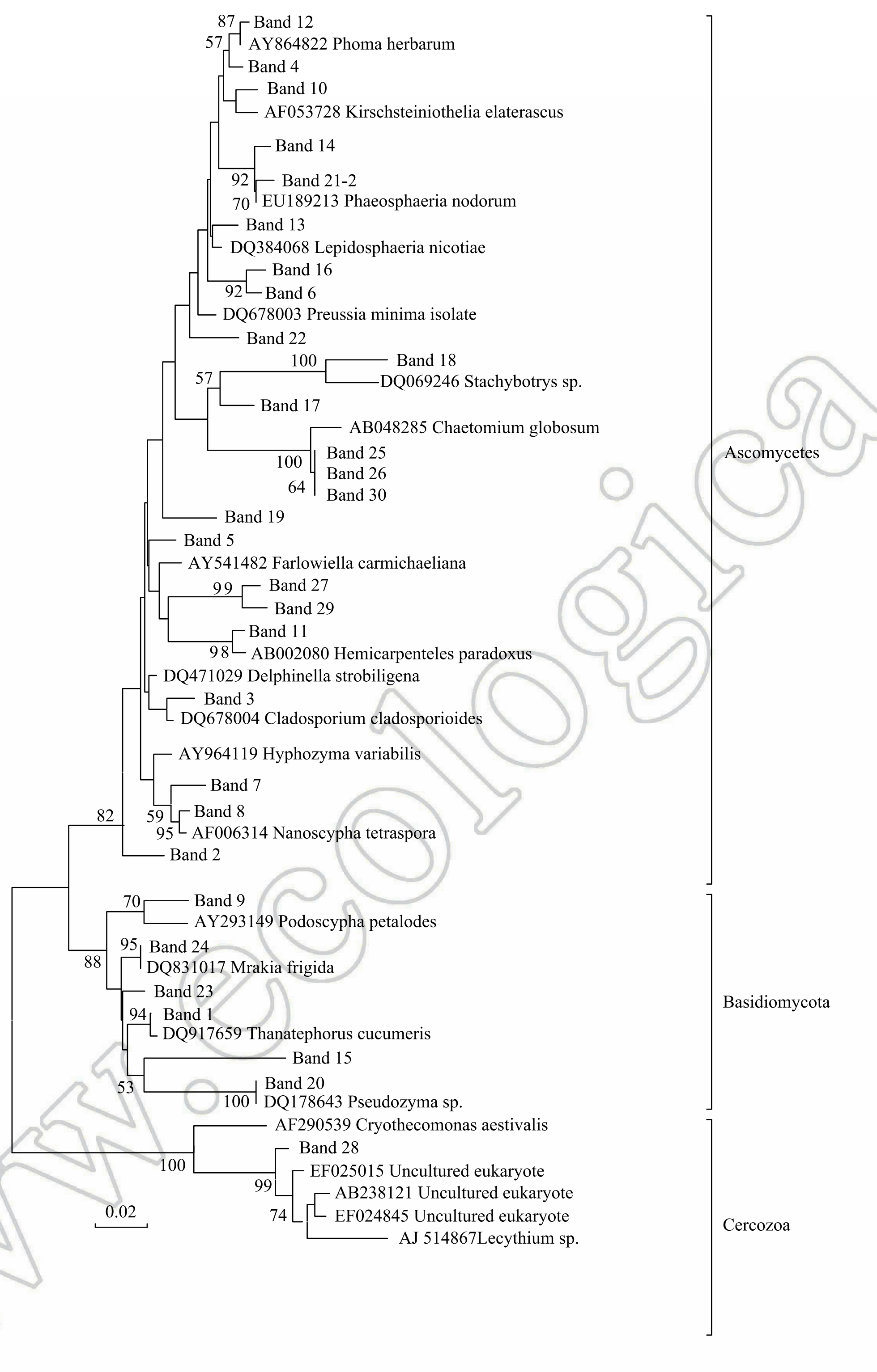


图 7　真菌 ITS 基因系统发育树

Fig.7　Phylogenetic relationships among fungal sequences in soils from Mount Everest, on the Tibetan Plateau

生物类群造成极大的危害,导致土壤微生物多样性降低[32]。与此同时,高山温度会随海拔升高而降低,Lipson等人针对不同季节和海拔梯度下细菌群落结构与温度的关系研究中发现,低海拔地区微生物群落对温度较高海拔地区更为敏感[8,39]。

对细菌 DGGE 主要条带的克隆测序分析结果显示,变形菌纲(Proteobacteria)在低海拔和高海拔样品中均有分布,说明变形菌是青藏高原土壤的优势菌群;芽单胞菌仅出现在了高海拔样品中,这可能与芽单胞菌易受

环境湿度的影响有关[40]。DeBruyn 等通过对南极旱地土壤、高山干旱土壤和高山苔原等 13 个不同类型土壤中芽单胞菌丰度和群落组成的研究发现,芽单胞菌相对丰度与水分负相关,芽单胞菌适宜在较为干燥的环境中生存[41]。本研究中低海拔样品主要分布在日喀则地区,其降水含量较高海拔样品丰沛,相对较高的降水量会使低海拔样品的芽单胞菌代谢受到抑制,而高海拔相对干燥的环境促进了芽单胞菌的生长繁殖,使芽单胞菌成为高海拔样品中的优势菌群。放线菌纲(Actinobacteria)主要分布在低海拔样品中出现,较少在高海拔样品中发现,说明放线菌随着海拔高度的增加而减少,这与以往对西藏土壤放线菌研究结果相似,即放线菌数量随海拔升高,冻结期增长显著减少[42]。

对真菌 DGGE 主要条带的克隆测序结果显示子囊菌门(Ascomycetes)广泛分布在低海拔和高海拔样品中,在 4000m 海拔样品中也检测到部分担子菌门(Basidiomycota),但子囊菌门(Ascomycetes)是主要优势菌群。此外,利用真菌引物 NS1/Fung GC 还回收到部分与丝足虫类(Cercozoa)原生生物如 Cryothecomonas, Lecythium 等高度相似的序列,但这些序列仅分布在高海拔冰雪覆盖的样品中,表明这些序列所代表的生物具有较强的耐寒能力,与以往的研究相类似。如 Cryothecomonas 最早在南极海冰和冰缘区被发现[43-44],并相继在冰芯,沉积物和水柱[45-48]中被发现。此外,Thaler 等利用特异性荧光原位杂交技术对北极和亚北极海域中的 Cryothecomonas 研究发现 Cryothecomonas 丰度与冰和融雪量显著正相关,说明 Cryothecomonas 可以作为北极冰柱融化的敏感指标[48]。虽然本研究选择 DGGE 图谱测序的代表条带可能不会完全反映土壤中微生物群落结构,但至少代表了样品中优势微生物类群的变化特征。

4　结论

本文综合采用平板活菌计数,定量 PCR,PLFA 和 DGGE 技术探讨了青藏高原珠穆朗玛峰北坡从坡底牧草和农业土壤,到海拔 6550m 高度的高山土壤或风化不完全的砂砾样品中微生物的生物量和群落组成特征。结果表明受海拔依赖的相关因子,如养分(有机质、总氮)、温度等的影响,无论是活性细菌和真菌的 CFU 数,细菌 16S rRNA 和真菌 ITS 基因丰度,还是 PLFA 所代表的微生物量和物种多样性均随海拔升高明显降低。此外,PLFA 中代表革兰氏阳性细菌的组分在高于 5350m 以上的样品中缺失,而代表革兰氏阴性细菌的部分组分和真菌组分在所有样品中都有分布,表明革兰氏阳性细菌比革兰氏阴性细菌和真菌对海拔梯度变化更为敏感,该结果与不同样品中细菌 DGGE 指纹图谱随海拔高度聚集成簇,而真菌 DGGE 指纹图谱随海拔高度变化无明显聚集的结果相一致,表明海拔高度显著影响细菌群落组成,但对真菌群落变化没有显著影响。此外,对细菌和真菌 DGGE 主要条带的回收测序分析结果显示变形菌纲是珠峰不同海拔高度土壤/砂砾样品中的优势菌群,芽单胞菌是高海拔样品中的优势菌群,而放线菌主要分布在低海拔样品中;真菌以子囊菌门为优势菌群。此外,利用真菌的引物还在高海拔冰雪覆盖样品回收到丝足虫类原生生物,代表了冰雪覆盖样品中所特有真核生物类群。这些结果为认识全球变化对高寒区生态系统的影响以及发掘高寒地区土壤微生物资源提供了重要信息。

参考文献(References):

[1] 傅伯杰. 中国学科发展战略: 土壤生物学. 北京: 科学出版社, 2016.

[2] 黄昌勇. 土壤学: 面向 21 世纪课程教材. 北京: 中国农业出版社, 2000.

[3] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, Landi L, Pietramellara G, Renella G. Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science, 2003, 54(4): 655-670.

[4] Romaniuk R, Giuffré L, Costantini A, Nannipieri P. Assessment of soil microbial diversity measurements as indicators of soil functioning in organic and conventional horticulture systems. Ecological Indicators, 2011, 11(5): 1345-1353.

[5] Djukic I, Zehetner F, Mentler A, Gerzabek M H. Microbial community composition and activity in different Alpine vegetation zones. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(2): 155-161.

[6] Walker D A, Jia G J, Epstein H E, Raynolds M K, Chapin III F S, Copass C, Hinzman L D, Knudson J A, Maier H A, Michaelson G J, Nelson F, Ping C L, Romanovsky V E, Shiklomanov N. Vegetation-soil-thaw-depth relationships along a low-arctic bioclimate gradient, Alaska: synthesis

of information from the ATLAS studies. Permafrost and Periglacial Processes, 2003, 14(2): 103-123.

[7] Bryant J A, Lamanna C, Morlon H, Kerkhoff A J, Enquist B J, Green J L. Microbes on mountainsides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(S1): 11505-11511.

[8] Margesin R, Jud M, Tscherko D, Schinner F. Microbial communities and activities in alpine and subalpine soils. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 67(2): 208-218.

[9] Shen C C, Xiong J B, Zhang H Y, Feng Y Z, Lin X G, Li X Y, Liang W J, Chu H Y. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. Soil Biology and Biochemistry, 2013, 57: 204-211.

[10] Wu S H, Yin Y H, Zheng D, Yang Q Y. Climatic trends over the Tibetan Plateau during 1971-2000. Journal of Geographical Sciences, 2007, 17(2): 141-151.

[11] Xu Z H, Chen C R, He J Z, Liu J X. Trends and challenges in soil research 2009: linking global climate change to local long-term forest productivity. Journal of Soils and Sediments, 2009, 9(2): 83-88.

[12] 芦晓飞. 西藏米拉山高寒草甸土壤微生物多样性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.

[13] 蔡晓布, 彭岳林. 西藏高原不同海拔区域丛枝菌根真菌群落的变化. 应用生态学报, 2015, 26(9): 2803-2810.

[14] 李超男, 李家宝, 李香真. 贡嘎山海拔梯度上不同植被类型土壤甲烷氧化菌群落结构及多样性. 应用生态学报, 2017, 28(3): 805-814.

[15] Zhang L M, Wang M, Prosser J I, Zheng Y M, He J Z. Altitude ammonia-oxidizing bacteria and archaea in soils of Mount Everest. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(2): 208-217.

[16] Bardgett R D, Hobbs P J, Frostegård Å. Changes in soil fungal: bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. Biology and Fertility of Soils, 1996, 22(3): 261-264.

[17] Frostegård Å, Bååth E, Tunlio A. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. Soil Biology and Biochemistry, 1993, 25(6): 723-730.

[18] Kemp P F, Cole J J, Sherr B F, Sherr E B. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Florida: Lewis Publishers, 1993: 271-284.

[19] 颜慧, 蔡祖聪, 钟文辉. 磷脂脂肪酸分析方法及其在土壤微生物多样性研究中的应用. 土壤学报, 2006, 43(5): 851-859.

[20] Tunlid A, White D C. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil // Stotzky G, Bollag J M, eds. Soil Biochemistry. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc., 1992, 7: 229-262.

[21] Harwood J L, Russell N J. Lipids in Plants and Microbes. Netherlands: Springer, 1984.

[22] Stahl P D, Klug M J. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4136-4146.

[23] Klamer M, Bååth E. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18: 2ω6, 9. Soil Biology and Biochemistry, 2004, 36(1): 57-65.

[24] Schelble R T, McDonald G D, Hall J A, Nealson K H. Community structure comparison using FAME analysis of desert varnish and soil, Mojave Desert, California. Geomicrobiology Journal, 2005, 22(7/8): 353-360.

[25] Yu Z T, Morrison M. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4800-4806.

[26] May L A, Smiley B, Schmidt M G. Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(9): 829-841.

[27] Suzuki M T, Taylor L T, Delong E F. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5′-nuclease assays. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(11): 4605-4614.

[28] Fierer N, Jackson J A, Vilgalys R, Jackson R B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 4117-4120.

[29] Hu Y J, Xiang D, Veresoglou S D, Chen F L, Chen Y L, Hao Z P, Zhang X, Chen B D. Soil organic carbon and soil structure are driving microbial abundance and community composition across the arid and semi-arid grasslands in northern China. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 77(1): 51-57.

[30] 吴愉萍. 基于磷脂脂肪酸(PLFA)分析技术的土壤微生物群落结构多样性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.

[31] 任佐华, 张于光, 李迪强, 肖启明, 蔡重阳. 三江源地区高寒草原土壤微生物活性和微生物量. 生态学报, 2011, 31(11): 3232-3238.

[32] 林超峰, 陈占全, 薛泉宏, 来航线, 陈来生, 张登山. 青海三江源区植被退化对土壤养分和微生物区系的影响. 应用与环境生物学报, 2007, 13(6): 788-793.

[33] 曾智科. 三江源区高寒草甸土壤微生物季节动态及对草地退化的响应[D]. 西宁: 青海师范大学, 2009.

[34] Frey S D, Knorr M, Parrent J L, Simpson R T. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. Forest Ecology and Management, 2004, 196(1): 159-171.

[35] Wallenstein M D, McNulty S, Fernandez I J, Boggs J, Schlesinger W H. Nitrogen fertilization decreases forest soil fungal and bacterial biomass in three long-term experiments. Forest Ecology and Management, 2006, 222(1/3): 459-468.

[36] Janssens I A, Dieleman W, Luyssaert S, Subke J A, Reichstein M, Ceulemans R, Ciais P, Dolman A J, Grace J, Matteucc G, Papale D, Piao S L, Schulze E D, Tang J, Law B E. Reduction of forest soil respiration in response to nitrogen deposition. Nature Geoscience, 2010, 3(5): 315-322.

[37] 沈萍, 陈向东. 微生物学(第八版). 北京: 高等教育出版社, 2016.

[38] 蔡晓布, 彭岳林, 冯固, 钱成. 西藏高原草地植物 AM 真菌多样性及其环境影响因子研究. 土壤学报, 2005, 42(4): 642-651.

[39] Lipson D A. Relationships between temperature responses and bacterial community structure along seasonal and altitudinal gradients. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 59(2): 418-427.

[40] Fawaz M N. Revealing the ecological role of *Gemmatimonadetes* through cultivation and molecular analysis of agricultural soils[D]. Knoxville: University of Tennessee, 2013.

[41] DeBruyn J M, Nixon L T, Fawaz M N, Johnson A M, Radosevich M. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(17): 6295-6300.

[42] 薛泉宏, 谭志远, 朱铭莪, 张晓琳. 西藏土壤放线性菌初步研究. 西北农业大学学报, 1999, 27(1): 28-32.

[43] Garrison D L, Buck K R. The biota of Antarctic pack ice in the Weddell Sea and Antarctic Peninsula regions. Polar Biology, 1989, 10(3): 211-219.

[44] Garrison D L, Buck K R. Protozooplankton in the Weddell Sea, Antarctica: abundance and distribution in the ice-edge zone. Polar Biology, 1989, 9(6): 341-351.

[45] Sime-Ngando T, Juniper S K, Demers S. Ice-brine and planktonic microheterotrophs from Saroma-ko Lagoon, Hokkaido (Japan): quantitative importance and trophodynamics. Journal of Marine Systems, 1997, 11(1/2): 149-161.

[46] Thomsen H A, Buck K R, Bolt P A, Garrison D L. Fine structure and biology of *Cryothecomonas* gen. nov. (Protista incertae sedis) from the ice biota. Canadian Journal of Zoology, 1991, 69(4): 1048-1070.

[47] Tillmann U, Hesse K J, Tillmann A. Large-scale parasitic infection of diatoms in the Northfrisian Wadden Sea. Journal of Sea Research, 1999, 42(3): 255-261.

[48] Thaler M, Lovejoy C. Distribution and diversity of a protist predator *Cryothecomonas* (Cercozoa) in Arctic marine waters. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2012, 59(4): 291-299.